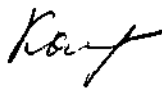


0-734600

На правах рукописи

УДК 612.017.1:616-097



КОЛИКОВА ЮЛИЯ ОЛЕГОВНА

**АУТОАНТИТЕЛА К ДНК В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
ЗДОРОВЫХ ЛИЦ**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре биохимии
Казанского государственного университета

Научный руководитель: Доктор биологических наук,
профессор Ишмухаметова Д.Г.

Официальные оппоненты: Доктор ветеринарных наук,
профессор Алимов А.М.

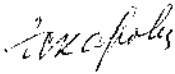
Доктор биологических наук,
старший научный сотрудник Коксин В.П.

Ведущая организация: Казанская государственная медицинская академия

Защита состоится «29» мая 2003 года в 12.00 часов на заседании
диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном
университете (420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 209).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке имени
Н.И.Лобачевского при КГУ.

Автореферат разослан «25» апреля 2003 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук  Аскарлова А.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Значительную часть иммуноглобулинов, циркулирующих в сыворотке крови у здоровых людей составляют аутоантитела к собственным антигенам организма, которые играют важную роль в регуляции иммунного ответа [Lacroix-Desmazes et al., 1998]. Особое место среди них занимают аутоантитела к ДНК, присутствие которых в сыворотке крови давно используется как клинический признак аутоиммунных заболеваний. Аутоантитела к ДНК в небольших количествах выявляли и в сыворотке крови здоровых людей, но долгое время этим данным не придавали значения.

Интерес к аутоантителам к ДНК и к их биологической роли в норме появился в середине 80-х годов. Было показано, что содержание аутоантител к ДНК у здоровых людей изменяется при стрессе и физических нагрузках [Шубик и Левин, 1985], с переменой климатических условий и сезонов года [Добродеева и Суслонova, 1990]. Рядом авторов отмечалось повышение уровня содержания аутоантител к ДНК при старении организма [Shuller et al., 1981; Kasjanov et al., 1984; Xavier et al., 1995].

Однако до сих пор не ясно, являются ли аутоантитела к ДНК обязательным компонентом сыворотки крови в норме. С одной стороны, в литературе приводятся сведения о присутствии аутоантител к ДНК у всех обследованных лиц в группах здоровых людей [Несвижский и Воробьев, 1996]. С другой стороны, имеются сообщения о том, что аутоантитела к ДНК обнаруживаются только у 15-28% здоровых лиц [Добродеева и Суслонova, 1990; Буковская, 1993]. До настоящего времени ряд исследователей придерживаются мнения о том, что аутоантитела к ДНК являются однозначным атрибутом патологического аутоиммунитета и отсутствуют в сыворотке крови здоровых людей [Azizah et al., 1996; Candore et al., 1997; Маркина и др., 2001].

Значительно возрос интерес к аутоантителам к ДНК в норме в связи с обнаружением способности этих аутоантител проникать через мембраны клеток [Yanase et al., 1997]. Было показано, что аутоантитела к ДНК могут соединяться с компонентами ядра и изменять активность экспрессии генов [Madaio et al., 1997]. Приведенные факты свидетельствуют о том, что биологическая роль аутоантител к ДНК в норме может быть связана с регуляцией активности генов и участием в фундаментальных биохимических процессах, не связанных с иммунологической защитой организма.

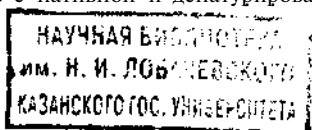
Одним из основных препятствий на пути к выяснению биологической роли аутоантител к ДНК в норме является отсутствие систематических исследований этих аутоантител в сыворотке крови здоровых людей. По этой же причине до сих пор остается неясной и роль аутоантител к ДНК в возникновении и развитии аутоиммунных патологий.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование аутоантител к ДНК в сыворотке крови здоровых лиц. Были поставлены следующие задачи:

- определить пороговый уровень содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови здоровых лиц;
- исследовать содержание аутоантител к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови мужчин и женщин разных возрастных групп;
- разработать схему выделения и очистки аутоантител к ДНК из сыворотки крови здоровых людей;
- охарактеризовать фракционный состав аутоантител, взаимодействующих с нативной и денатурированной ДНК у здоровых лиц разного возраста и пола.

Научная новизна. Установлен пороговый уровень содержания аутоантител к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови здоровых лиц. Показано, что у здоровых людей уровень содержания аутоантител к нативной ДНК колеблется в пределах 0,07-0,45, к денатурированной ДНК - в пределах 0,12-0,59 относительных единиц. Впервые выявлен половой диморфизм содержания аутоантител к ДНК. Средний уровень содержания аутоантител к обоим типам ДНК в сыворотке крови у женщин достоверно превышает аналогичные показатели у мужчин. Установлена неидентичность возрастной динамики изменений уровня содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови у мужчин и женщин. Впервые показано возрастное изменение соотношения субпопуляций аутоантител, специфичных к определенному типу ДНК и аутоантител, способных взаимодействовать как с нативной, так и с денатурированной ДНК. Высказано предположение о взаимосвязи субпопуляционного состава аутоантител к ДНК с возрастными изменениями гормонального профиля у здоровых людей.

Практическая значимость. Установление порогового уровня содержания аутоантител к ДНК позволяет судить о вероятном диапазоне их колебания в сыворотке крови здоровых людей. Данные об уровне содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови здоровых лиц разных возрастных групп и пола могут быть использованы в качестве дифференциального контроля при разработке диагностических тестов на основании определения аутоантител к ДНК. Полученные результаты указывают на необходимость использования в качестве точки отсчета - при оценке уровня содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови больных аутоиммунными заболеваниями - уровень аутоантител к ДНК в сыворотке крови здоровых людей соответствующего возраста и пола. Выявленный нами половой диморфизм возрастных изменений соотношения субпопуляций аутоантител, способных взаимодействовать с нативной и денатурированной ДНК, может быть



использован для ранней диагностики аутоиммунных заболеваний и выявления групп риска с учетом половой принадлежности здоровых лиц.

Апробация работы. Основные результаты исследований докладывались на III Республиканской научно-технической конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 1997); научно-практической конференции молодых ученых Казанской государственной медицинской академии (Казань, 1998); XII юбилейной конференции «Ферменты микроорганизмов» (Казань, 2001); VIII Всероссийском съезде неврологов (Казань, 2001); II Российской конференции молодых ученых России с международным участием (Москва, 2001); IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Республики Татарстан (Казань, 2001); III Съезде Биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), а также на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета в 1997-2003 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения результатов работы, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и 25 рисунков. Список использованной литературы включает 154 наименования, из них 120 - работы иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились образцы сыворотки крови практически здоровых людей, проходящих плановые медицинские профилактические осмотры в различных лечебных учреждениях г. Казани, не страдающих аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, не являющихся носителями ВИЧ-инфекции. В качестве положительного стандарта использована сыворотка крови больных системной красной волчанкой (СКВ) - пациентов Республиканской клинической больницы №2.

Содержание ААТ к ДНК определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) согласно методике, модифицированной ранее в нашей лаборатории [Саттарова, 1994]. В качестве антигена использовали нативную ДНК (нДНК) эритроцитов цыплят. Степень депротеинизации препарата ДНК оценивали по соотношению оптических плотностей раствора ДНК при длинах волн 280 и 260 нм (E_{280}/E_{260}), о нативности препарата ДНК судили по величине гиперхромного эффекта. Денатурированную ДНК (дДНК) получали методом тепловой денатурации. В качестве вторичных антител использовали меченные пероксидазой антитела против иммуноглобулинов человека, именуемые далее как «конъюгат». Рабочую

концентрацию конъюгата определяли, исходя из данных предварительного эксперимента по выяснению оптимального разведения каждой серии конъюгата.

Иммуноферментный анализ проводили по следующей схеме. В лунки активированных ультрафиолетовым светом планшетов вносили раствор ДНК (10 мкг/мл) на 0,1М фосфат - 0,05М цитратном буфере pH 5,0 (ЦБ). Несорбировавшуюся ДНК отмывали фосфатно-солевым буфером с твином - 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,2; 0,1М NaCl; 0,05% твин-20 (ФСБТ) - и вносили образцы сыворотки крови, разведенные ФСБТ в соотношении 1:100. После инкубации с сывороткой в лунки планшетов добавляли рабочий раствор конъюгата на ФСБТ и далее - субстратную смесь, содержащую 0,05% H₂O₂ и 0,4 мкг/мл орто-фенилендиамина в ЦБ. Уровень ответа цветной реакции ИФА измеряли на спектрофотометре "Multiskan" ("Flow", Великобритания) при длине волны 492 нм (ОП₄₉₂).

Для стандартизации результатов всей серии экспериментов параллельно анализировали одну и ту же положительно реагирующую сыворотку с высоким содержанием ААТ к ДНК - "стандарт". Содержание ААТ к ДНК в сыворотке крови оценивали в относительных единицах (отн.ед.), которые вычисляли как отношение $\overline{\text{ОП}}_{492\text{опыта}}/\overline{\text{ОП}}_{492\text{стандарта}}$. Результаты исследования каждого образца сыворотки представляли при помощи среднего из 4 повторов, ошибки среднего и коэффициента вариации. В работе использовали индивидуальные показатели содержания ААТ, для которых коэффициент вариации не превышал 10%. Для анализа выборок индивидуальных значений уровня содержания ААТ к ДНК применяли структурное среднее - медиану - и коэффициент асимметрии [Лакин, 1990]. Достоверность различий оценивали с использованием непараметрических ранговых критериев Краскелла-Уоллиса и Манна-Уитни.

Специфичность и перекрестную реактивность ААТ к нативной и денатурированной ДНК исследовали методом истощения сыворотки соответствующими антигенами в диапазоне концентраций истощающего антигена 0,3-10 мкг/мл. Истощенную таким образом сыворотку вносили на планшет с иммобилизованной ДНК, далее реакцию ИФА проводили по описанной выше схеме. Специфичность ААТ выражали в процентах истощения (% истощения) сыворотки и вычисляли по следующей формуле:

$$\% \text{ истощения} = \left(1 - \frac{\overline{M}_2}{\overline{M}_1}\right) * 100 ,$$

где \overline{M}_2 - среднее из экспериментальных повторов истощенной сыворотки, \overline{M}_1 - среднее из повторов неистощенного контроля этого же образца сыворотки крови.

Выделение из сыворотки **крови фракций, обогащенных ЛАТ к ДНК**, включало в себя высаливание фракции иммуноглобулинов сульфатом аммония, гель-фильтрацию на акрилексе Р-200 и аффинную хроматографию на ДНК-целлюлозе. Состав препаратов белка на разных стадиях выделения исследовали методом электрофореза в ПААГ.

Аффинный сорбент готовили в лабораторных условиях по методу Литман [Litman, 1968] с некоторой модификацией.

Аффинную хроматографию ААТ к ДНК проводили согласно модифицированному методу Лекаха с сотр. [Лекаха и др., 1991]. Все процедуры проводились при температуре 4°C в холодильной камере MiniCOLDLAB ("LKB Bromma", Швеция). ДНК-целлюлозу суспендировали в буфере А (0,02М трис-НСl, 0,15М NaCl, рН 7,2), загружали в колонку (4,6x1,5 см) и последовательно промывали буфером А; 0,7М NaCl; 0,1М глицин-НСl (рН 2,33), затем снова уравнивали буфером А. На колонку наносили обессоленную гель-фильтрацией фракцию иммуноглобулинов, колонку промывали буфером А до нулевых значений оптической плотности. Связавшийся с аффинным сорбентом белок последовательно элюировали растворами 0,7М NaCl; 0,1М глицин-NaOH (рН 10,4) и буфером А.

Содержание ААТ к ДНК в фракциях определяли методом иммуноферментного анализа и выражали в единицах удельной связывающей способности, которые вычисляли как отношение оптической плотности препарата при длине волны 492 нм в реакции ИФА к количеству белка (ОП492/МГ белка).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами исследовано **содержание ААТ к нативной и денатурированной ДНК** в сыворотке крови практически здоровых людей в возрасте от 4 до 82 лет (140 человек). Результаты анализа представлены на рис. 1.

ААТ к обоим типам ДНК обнаружены во всех анализируемых образцах сыворотки крови. Уровень содержания ААТ к нДНК колеблется в пределах от 0,06 до 0,49 отн.ед. Значительная часть индивидуальных показателей уровня содержания ААТ к нДНК образует компактную группу, в которой содержание ААТ не превышает 0,25 отн.ед. Тем не менее, у 20% обследованных лиц показатели уровня содержания ААТ к нДНК располагаются значительно выше этого уровня.

Индивидуальные значения содержания ААТ к дДНК находятся в пределах 0,06-0,68 отн.ед. В большинстве образцов сыворотки крови уровень содержания ААТ к дДНК не превышает 0,46 отн.ед. В то же время, у 11% обследованных людей данные показатели существенно выше этого значения. Различия индивидуальных показателей содержания ААТ к дДНК в ряде случаев достигают величины целого порядка.

отн.ед.

отн.ед.

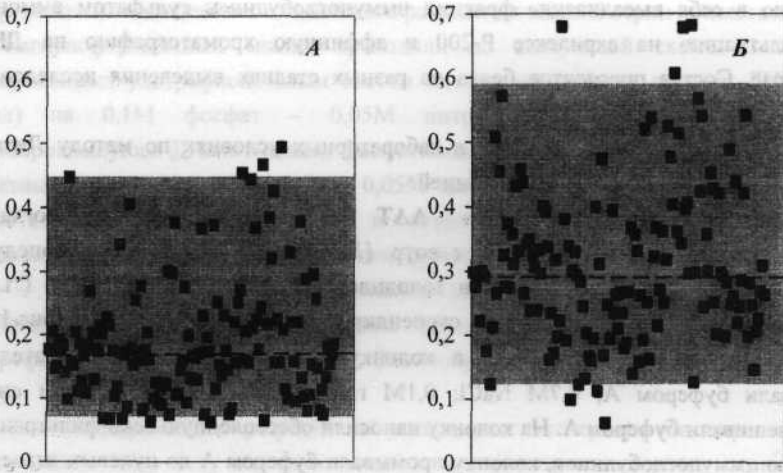


Рис. 1. Содержание ААТ к ДНК в сыворотке крови здоровых людей.

Содержание ААТ к нДНК (А) и к дДНК (Б); затененная область—пороговый уровень содержания ААТ в норме, нижняя граница соответствует 2,5-му перцентилю, верхняя—97,5-му перцентилю, пунктиром обозначена медиана.

Анализ распределения частот индивидуальных значений уровня содержания ААТ к ДНК показал, что варьирование содержания ААТ к обоим типам ДНК проявляет выраженную положительную асимметрию и не подчиняется законам нормального распределения. Коэффициент асимметрии распределения уровня содержания ААТ к обоим типам ДНК существенно превышает допустимое для нормального распределения значение на уровне значимости 95%. Это делает некорректным использование для характеристики полученных выборок таких статистических параметров, как среднее и стандартное отклонение. В связи с этим оценку среднего уровня содержания ААТ к ДНК проводили с использованием медианы и перцентилей - 2,5-го и 97,5-го [Гланц, 1999]. Вычисленный таким образом пороговый уровень содержания ААТ в норме к нативной ДНК находится в пределах 0,07-0,45 отн.ед., ААТ к денатурированной ДНК - 0,12-0,59 отн.ед., со средним значением 0,17 и 0,29 отн.ед. для ААТ к нативной и денатурированной ДНК, соответственно.

Анализ данных по **содержанию ААТ к ДНК в сыворотке крови мужчин и женщин** показывает, что у женщин средний уровень содержания ААТ к нДНК составляет 0,18 (0,08; 0,45) отн.ед., что достоверно выше аналогичного показателя у мужчин ($P < 0,05$), у которых содержание ААТ к нДНК составляет в среднем 0,14

(0,06; 0,22) отн.ед.. (рис.2). У женщин содержание ААТ к ДНК также превышает аналогичные показатели у мужчин: 0,31 (0,13; 0,64) и 0,24 (0,12; 0,46) отн.ед., соответственно.

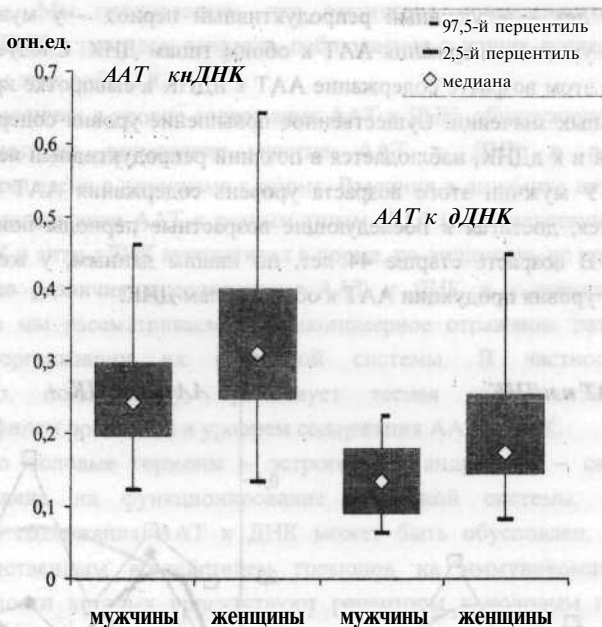


Рис.2. Уровень содержания ААТ к ДНК у здоровых лиц разного пола

Обращает на себя внимание тот факт, что повышенное содержание ААТ к обоим типам ДНК обнаруживается у женщин в возрасте 37-44 лет. Наименьшее содержание ААТ к ДНК выявлено у мужчин в возрасте 15-26 лет (за исключением одного человека 41 года), у женщин - в возрасте 21-23 лет.

Эти данные наводят на мысль о том, что уровень содержания ААТ в сыворотке крови здоровых лиц зависит от возраста и половой принадлежности обследуемых.

Влияние возраста на уровень содержания ААТ к ДНК в сыворотке крови исследовали, распределив мужчин и женщин на 6 групп, согласно физиологическим границам определенных возрастных периодов жизни человека [Аршавский, 1982; Сметник и Тумилович, 1995]. На рис.3 представлена динамика возрастных изменений уровня содержания ААТ к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови мужчин и женщин.

ААТ к обоим типам ДНК обнаруживаются уже в детском возрасте. Пубертатный период (11-15 лет) характеризуется существенным увеличением

уровня содержания ААТ к дДНК у мальчиков. Некоторое повышение уровня ААТ к дДНК наблюдается и у девочек этого возраста. Содержание ААТ к нДНК в этот период как у девочек, так и у мальчиков, изменяется незначительно. В возрасте от 16 до 35 лет - в активный репродуктивный период - у мужчин наблюдается снижение уровня содержания ААТ к обоим типам ДНК. Следует отметить, что у мужчин в этом возрасте содержание ААТ к нДНК в сыворотке крови снижается до минимальных значений. Существенное повышение уровня содержания ААТ как к нДНК, так и к дДНК, наблюдается в поздний репродуктивный период (36-43 лет) у женщин. У мужчин этого возраста уровень содержания ААТ к ДНК несколько повышается, достигая в последующие возрастные периоды показателей детского возраста. В возрасте старше 44 лет, по нашим данным, у женщин происходит снижение уровня продукции ААТ к обоим типам ДНК.

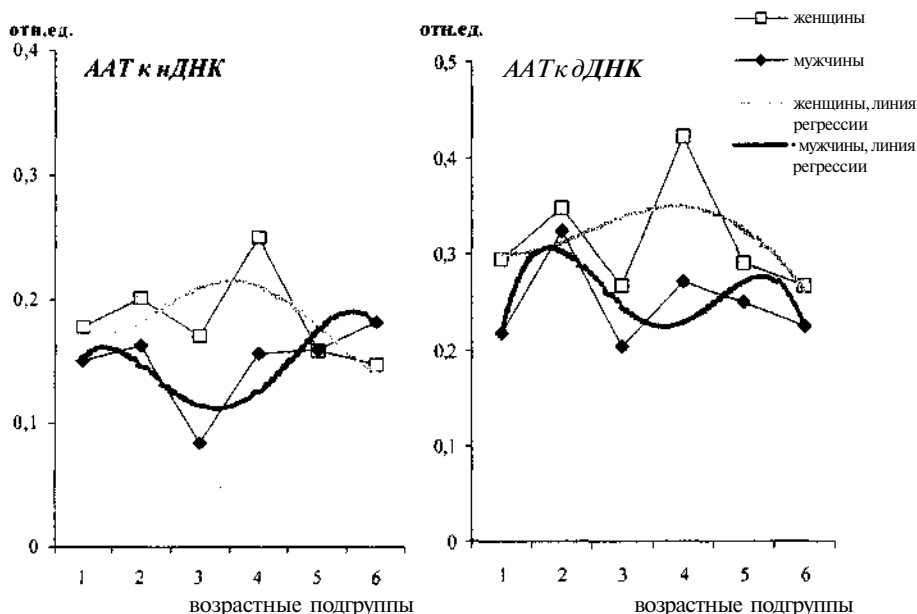


Рис.3. Зависимость уровня содержания ААТ к ДНК в сыворотке крови мужчин и женщин от возраста

Возрастные подгруппы: 1 - 4-10 лет, 2 - 11-15, 3 - 16-35, 4 - 36-43, 5 - 44-59, 6 - старше 60 лет.

Мы не обнаружили достоверного увеличения уровня содержания ААТ к дДНК у лиц старше 60 лет, о чем сообщалось ранее другими авторами, которые связывали это с дегенеративными процессами в стареющем организме, протекающими с высвобождением метаболитов с антигенной активностью [Xavier et al., 1995].

Известно, что к 60 годам практически заканчивается возрастная инволюция тимуса. Это отражается на Т-клеточном звене иммунитета, в частности, снижается функция Т-хелперов, что, в свою очередь, ведет к угнетению В-клеточного звена иммунной системы. Мы предполагаем, что отсутствие повышенного уровня продукции ААТ к ДНК в пожилом возрасте, наблюдаемая в наших исследованиях является следствием этих событий.

Возрастные различия в уровне содержания ААТ к ДНК, обнаруженные нами, косвенно указывают на возможное участие ААТ к ДНК в регуляции физиологических процессов в организме в норме. Различия в динамике возрастных изменений уровня содержания ААТ к разным типам ДНК свидетельствуют о том, что роль анти-нДНК и анти-дДНК аутоантител в норме, по-видимому, не идентична.

Обнаруженные различия в содержании ААТ к ДНК в сыворотке крови мужчин и женщин мы рассматриваем как закономерное отражение различий в функциональной организации их иммунной системы. В частности, мы предполагаем, что, по-видимому, существует тесная взаимосвязь между гормональным профилем организма и уровнем содержания ААТ к ДНК.

Известно, что половые гормоны - эстрогены и андрогены - оказывают существенное влияние на функционирование иммунной системы. Половой диморфизм уровня содержания ААТ к ДНК может быть обусловлен, с одной стороны, непосредственным воздействием гормонов на иммунокомпетентные клетки, на поверхности которых присутствуют рецепторы к половым гормонам [Martin, 2000]. Другим аспектом влияния половых гормонов на функционирование иммунной системы является модулирование баланса секретируемых иммунокомпетентными клетками цитокинов, участвующих в регуляции иммунного ответа. Из литературы известно, что эстрогены стимулируют продукцию интерлейкина-4, ответственного за поликлональную активацию клеток, продуцирующих ААТ к нДНК [Huber et al., 1999], в то время как тестостерон способен угнетать продукцию ААТ к нДНК [Kanda et al., 1997].

Принимая во внимание эти данные, более высокий уровень продукции ААТ к ДНК у женщин по сравнению с мужчинами мы объясняем стимулирующим влиянием эстрогенов на аутореактивные клоны В-лимфоцитов. Участие эстрогенов в поликлональной активации аутореактивных В-клеток является важным звеном и в развитии аутоиммунных заболеваний у женщин, которые встречаются у них в 10 раз чаще, чем у мужчин [Martin, 2000]. Более низкий уровень содержания ААТ к ДНК в сыворотке крови мужчин, по-видимому, обусловлен ингибирующим влиянием тестостерона на синтез ААТ к ДНК.

Существует ли корреляция между уровнем продукции ААТ к ДНК в разные возрастные периоды у мужчин и женщин и выработкой половых гормонов?

Известно, что максимальное содержание эстрогена в сыворотке крови у женщин обнаруживается в поздний репродуктивный период, т.е. в 35-43 лет [Сметник и Тумилович, 1995]. По нашим данным, именно период от 36 до 43 лет характеризуется наиболее высоким уровнем содержания ААТ как к нДНК, так и к дДНК. По-видимому, увеличение уровня продукции ААТ к ДНК, обнаруживаемое у женщин в этом возрасте, связано с увеличением синтеза эстрогена. Далее с возрастом уровень эстрогенов в сыворотке крови снижается, что совпадает со снижением уровня продукции антител к ДНК за границами менопаузы.

По результатам наших исследований, еще один период с высоким содержанием ААТ к обоим типам ДНК, как у мужчин, так и у женщин, приходится на возраст от 11 до 15 лет. С одной стороны, это может быть обусловлено нарастанием продукции половых гормонов в организме в этот возрастной период. С другой стороны, в этом возрасте происходит резкое увеличение пролиферации клеток репродуктивных органов. В силу того, что ААТ к ДНК способны модулировать генную экспрессию, можно предположить, что увеличение уровня содержания ААТ в этот период может быть связано с усилением пролиферативных процессов.

Из литературы известно, что тестостерон подавляет продукцию ААТ к нДНК [Kanda et al., 1997]. По-видимому, в целом более низкий и относительно стабильный уровень содержания ААТ к ДНК в сыворотке крови мужчин является отражением влияния тестостерона. Выявленное нами снижение содержания ААТ к нДНК у мужчин в период 16-35 лет, возможно, обусловлено тем, что в этот период уровень тестостерона в сыворотке крови у мужчин, по данным литературы, достигает максимальных значений.

Следует заметить, что возрастная динамика уровня содержания ААТ к нДНК отличается от таковой для ААТ к дДНК. Это указывает на возможные различия в функциональных характеристиках ААТ к нативной и денатурированной ДНК. Кроме того, не исключено, что физиологические изменения, происходящие в организме с возрастом, могут быть связаны с изменениями субпопуляционного состава ААТ.

Проведенные нами исследования уровня содержания ААТ к нДНК и дДНК в сыворотке крови здоровых мужчин и женщин, принадлежащих к разным возрастным группам, показывают, что в возрастной динамике содержания ААТ к ДНК в указанных группах имеются значительные различия. Эти различия, с одной стороны, могут являться отражением количественных изменений в уровнях продукции ААТ, реагирующих с нДНК или с дДНК. С другой стороны, не следует исключать и возможность качественных изменений среди субпопуляций ААТ, направленных против нативной и денатурированной ДНК. Мы предполагаем, что, в соответствии с половой принадлежностью, в разные периоды онтогенеза в

организме здорового человека могут вырабатываться субпопуляции ААТ, предпочтительно взаимодействующих с нДНК или с дДНК, либо способных реагировать как с нДНК, так и с дДНК.

Для выяснения данного предположения мы исследовали специфичность анти-нДНК и анти-дДНК ААТ в сыворотке крови здоровых лиц методом истощения, когда сыворотка крови непосредственно перед внесением на планшет с иммобилизованным антигеном инкубируется с добавлением этого же антигена. По уровню интенсивности остаточной реакции ИФА таким образом можно оценить, насколько специфично ААТ взаимодействуют со «своим» АГ. Параллельно с оценкой специфичности, исследовали способность ААТ к нДНК перекрестно реагировать с дДНК. В отношении ААТ к дДНК анализировали, соответственно, их способность вступать в перекрестные взаимодействия с нДНК. Наличие такой перекрестной реактивности характеризует полиспецифичность ААТ, иными словами - способность ААТ вступать в реакцию с «чужим» антигеном. При вычислении соотношения субпопуляций аутоантител, специфичных к отдельным типам ДНК и аутоантител, способных вступать во взаимодействие как с нДНК, так и с дДНК, были получены следующие показатели (таблица 1).

Таблица 1

Субпопуляции ААТ к ДНК (в %)

пол	возраст	ААТ _{кнДНК}	ААТ _{кдДНК}	ААТ _{кн-, дДНК}
мужчины	4-10 лет	20	36	44
	11-15 лет	37	58	5
	16-35 лет	18	74	8
	36-43 лет	1	98	1
	44-59 лет	43	52	5
	от 60 лет	38	53	9
женщины	4-10 лет	30	60	10
	11-15 лет	28	68	4
	16-35 лет	21	70	9
	36-43 лет	24	51	25
	44-59 лет	16	63	21
	от 60 лет	25	56	19

Как видно из табл. 1, содержание ААТ, специфичных к дДНК, у женщин отличается стабильностью, в течение жизни оно изменяется незначительно. Также не подвержено существенным колебаниям у женщин содержание ААТ, специфичных преимущественно к нДНК - оно варьирует в пределах 20-30%.

Содержание ААТ, специфичных к дДНК, в сыворотке крови мужчин на протяжении жизни постепенно возрастает, достигая максимума в возрасте 36-43 лет, затем снижается и стабилизируется в пределах 52-53%.

Содержание ААТ, преимущественно реагирующих с нДНК, у мужчин в возрасте от 4 до 35 лет колеблется в пределах 18-37%. Для возраста 36-43 лет у мужчин характерно минимальное содержание ААТ к нДНК с соответствующим значительным увеличением содержания ААТ к дДНК. Затем содержание ААТ, специфичных к нДНК вновь возрастает и стабилизируется в пределах 38-43%.

Полиспецифичные ААТ, способные взаимодействовать как с нДНК, так и с дДНК, у мужчин преобладают в период детства. С возрастом доля таких ААТ значительно снижается и стабилизируется в пределах 10%. У женщин, напротив, отмечается обратная тенденция. В период до 36 лет содержание полиспецифичных ААТ, реагирующих как с нДНК, так и с дДНК, не превышает 10%. Далее оно возрастает более чем в два раза и стабилизируется на уровне 20%.

Чем объясняется изменение соотношения субпопуляций ААТ к ДНК с возрастом? В литературе практически отсутствуют исследования, касающиеся субпопуляционного состава ААТ в сыворотке крови здоровых людей. Существует предположение о том, что изменение характера аутореактивности с возрастом может быть связано с возникновением соматических мутаций в генах, кодирующих V-области ААТ [Ray et al., 1996]. Однако остается неясным, являются ли такие мутации причиной варьирования специфичной аутореактивности или они являются только механизмом, обслуживающим потребность в подобных вариациях.

При определении содержания ААТ необходимо учитывать тот факт, что сыворотка крови человека является многокомпонентной системой и содержит значительное количество разнотипных белков. Поэтому логично предположить, что на взаимодействие ААТ с молекулой ДНК и на стабильность образующихся иммунных комплексов АГ-АТ могут оказывать влияние другие белки сыворотки. В связи с этим мы выделили из сыворотки крови здоровых лиц методом аффинной хроматографии на двух типах аффинных сорбентов (нДНК- и дДНК-целлюлозе) фракцию иммуноглобулинов, обогащенную ААТ к ДНК.

При хроматографии иммуноглобулинов сыворотки крови на ДНК-целлюлозе выявляются три фракции (рис.4): фракция, не связываемая с ДНК-сорбентом (I) и две содержащие ААТ к ДНК фракции, различающиеся по степени родства к сорбенту и элюируемые 0,7М раствором NaCl (II) и ОДМ глицин-NaOH, pH10,4 (III).

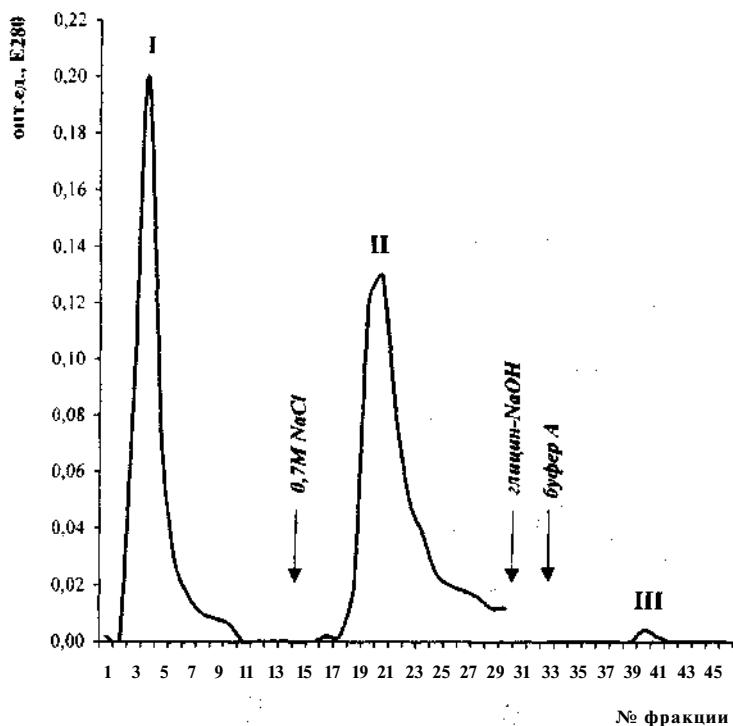


Рис.4. Аффинная хроматография иммуноглобулиновой фракции сыворотки крови на нДНК-целлюлозе (женщины, 16-35 лет)

I - фракция, не связывающаяся с ДНК-сорбентом; *II* - фракция, элюируемая 0,7М раствором NaCl; *III* — фракция, элюируемая глициновым буфером.

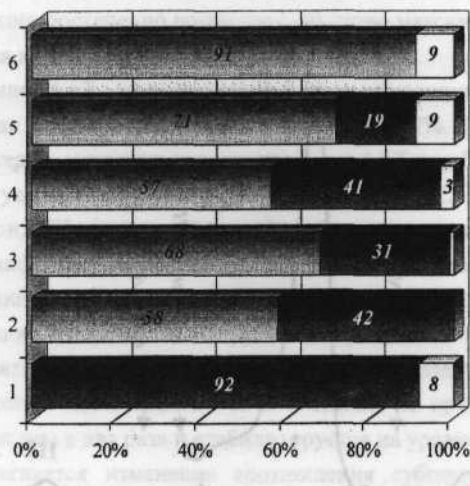
На рис.5 и 6 приведены результаты фракционирования пула иммуноглобулинов сыворотки крови мужчин и женщин на нДНК- и дДНК-целлюлозе. Внимание привлекает тот факт, что распределение белка во фракциях существенно различается у мужчин и женщин почти во всех возрастных подгруппах. Различия наблюдаются также в ДНК-связывающей способности фракций, содержащих ААТ к ДНК.

Результаты исследования удельной ДНК-связывающей способности ААТ фракций *II* и *III* приведены в таблице 2.

Фракции после аффинной хроматографии различаются по количеству белка, поэтому содержание ААТ мы оценивали в единицах удельной связывающей способности, которую вычисляли как отношение уровня ответа реакции ИФА к

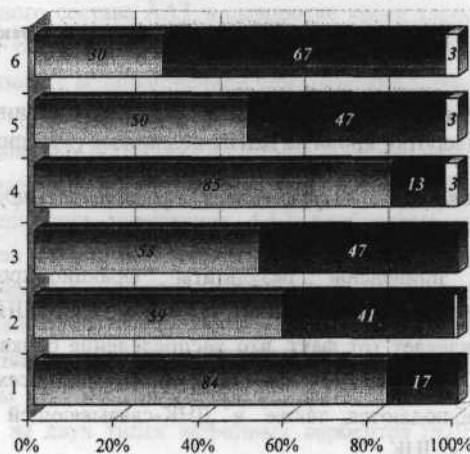
количеству белка. Этот способ был, на наш взгляд, наиболее оптимальным, поскольку при проведении гель-фильтрации мы обнаружили, что уровень ответа реакции ИФА исследуемого образца изменяется неадекватно степени его разведения.

возраст*



а) женщины

возраст*

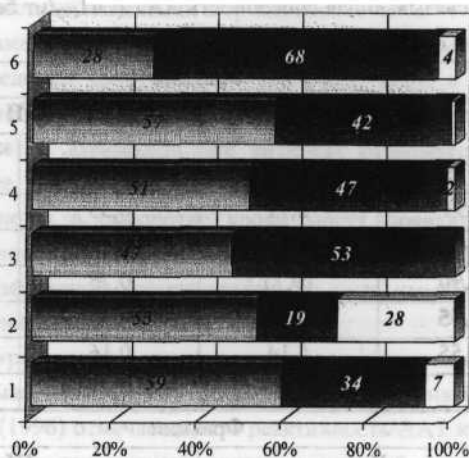


б) мужчины

Рис.5. Распределение иммуноглобулина во фракциях при аффинной хроматографии на ДНК-целлюлозе.

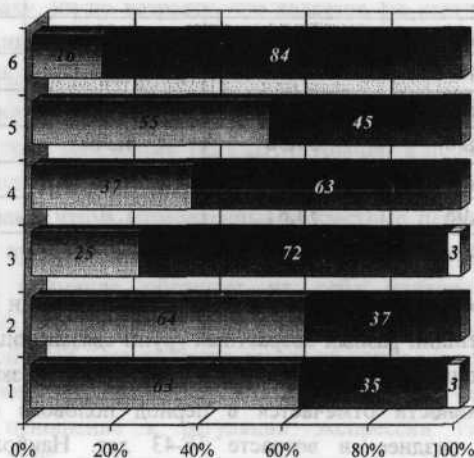
* - возрастные подгруппы: 1 - 4-10 лет; 2 - 11-15; 3 - 16-35; 4 - 36-43; 5 - 44-59; 6 - старше 60 лет.

возраст*



а) женщины

возраст*



б) мужчины

Рис.6. Распределение иммуноглобулина во фракциях при аффинной хроматографии на дДНК-целлюлозе.

* - возрастные подгруппы: 1 - 4-10 лет; 2-11-15; 3 - 16-35; 4 - 36-43; 5 - 44-59; 6 - старше 60 лет.

Удельная ДНК-связывающая способность ААТ (ОП₄₉₂/мг белка)

<i>ААТ_{кн}ДНК</i>		Фракции			
		II		III	
Возраст \ Пол		<i>жен</i>	<i>муж</i>	<i>жен</i>	<i>муж</i>
от 4 до 10		0,53	2,71	0,35	н
от 11 до 15		3,44	49,93	н	0
от 16 до 35		22,90	19,71	0,75	н
от 36 до 43		32,55	16,18	0,13	0,46
от 44 до 59		19,55	5,14	0,16	0,29
старше 60		н	34,38	0,61	0,70
<i>ААТ_к дДНК</i>		Фракции			
		II		III	
Возраст \ Пол		<i>жен</i>	<i>муж</i>	<i>жен</i>	<i>муж</i>
от 4 до 10		31,44	35,92	0,53	1,13
от 11 до 15		55,08	30,64	1,20	н
от 16 до 35		32,25	49,25	н	0,36
от 36 до 43		25,76	54,36	1,31	н
от 44 до 59		50,79	22,89	0	н
старше 60		10,08	35,81	1,70	н

н - фракция отсутствует

Наиболее активно реагируют с обоими типами ДНК в реакции ИФА фракции II. Однако у мужчин и женщин разных возрастных групп связывающая активность ААТ этих фракций в отношении ДНК не идентична. У мужчин резкое увеличение нДНК-связывающей активности отмечается в период полового созревания, у женщин - значительно позднее, в возрасте 36-43 лет. Наибольшая дДНК-связывающая активность фракции II у мужчин наблюдается в возрасте от 16 до 43 лет, у женщин - в период полового созревания и в 44-59 лет. Активность реакции ИФА во фракции III, элюированной 0,1М глицин-NaOH (pH 10,4), невысока и обнаруживается не во всех возрастных группах. По-видимому, эта фракция содержит какие-то особые, высокоаффинные ААТ к ДНК, которые очень прочно связываются с ДНК. Потребность в таких ААТ в организме в норме, вероятно, очень строго регулируется. Увеличение активности высокоаффинных ААТ к дДНК наблюдается у мужчин в детском возрасте, а у женщин - в период полового

созревания, в 36-43 лет, что еще раз указывает на возможность участия ААТ к ДНК в процессах возрастных изменений в организме.

Следует заметить, что подобная картина не выявляется в цельной сыворотке крови при проведении конкурентного ИФА (т.е. ИФА с истощением сыворотки нативной или денатурированной ДНК). По-видимому, это происходит потому, что, в сыворотке крови на взаимодействие антигена с антителом могут существенно влиять другие ее компоненты. Не исключена возможность, что в определенные возрастные периоды в сыворотке крови могут появляться какие-то факторы, способные модулировать специфичность ААТ к тем или иным типам ДНК, которые удаляются при аффинной хроматографии из пула иммуноглобулинов сыворотки крови в составе несвязавшейся фракции.

В литературе имеются лишь единичные работы по характеристике ААТ к ДНК цельной сыворотки и ААТ, фракционированных на аффинных сорбентах. В работе Williams (1996) отмечается, что реактивность ААТ к обоим типам ДНК, как фракционированных, так и содержащихся в цельной сыворотке, у здоровых лиц практически не различается. Однако авторы не разграничивают исследуемых ни по половому признаку, ни по возрасту, что является, на наш взгляд, некорректным в свете приведенных выше данных о возрастных изменениях содержания и специфичности ААТ к ДНК.

Полученные нами данные об изменении на протяжении жизни баланса ААТ, специфичных к тому или иному типу ДНК, говорят в пользу того, что эти ААТ в различные периоды онтогенеза, по-видимому, выполняют разные функции. На это указывает тот факт, что в определенные возрастные периоды в сыворотке крови здоровых людей преобладают ААТ, в разной мере способные реагировать с нДНК и дДНК. Особое внимание обращает на себя наличие в сыворотке крови субпопуляций ААТ, способных вступать во взаимодействие как с нативной, так и с денатурированной ДНК. Это свойство делает их наиболее вероятными кандидатами для взаимодействия с двуцепочечными и расплетенными участками ДНК в ядре, что имеет прямое отношение к регуляции экспрессии генов. Таким образом, аутоантитела к ДНК, постоянно присутствующие в сыворотке крови здоровых людей, по-видимому, являются универсальными регуляторами биохимических и физиологических процессов в организме.

ВЫВОДЫ

1. В сыворотке крови здоровых людей постоянно присутствуют аутоантитела к ДНК. Установлен пороговый уровень их содержания у здоровых лиц. Средний уровень содержания аутоантител к нативной и денатурированной ДНК составляет 0,17 и 0,29 отн.ед., соответственно.

2. Выявлено наличие полового диморфизма уровня содержания аутоантител к ДНК: средний уровень содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови у женщин достоверно превышает аналогичный показатель у мужчин.
3. Уровень содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови у здоровых лиц изменяется с возрастом. Содержание аутоантител к ДНК достигает максимальных значений у женщин в поздний репродуктивный период, у мужчин - в период полового созревания.
4. Обнаруженные нами возрастные и половые различия в соотношениях субпопуляций аутоантител, взаимодействующих с обоими типами ДНК и аутоантител, специфичных к нативной . или денатурированной ДНК, свидетельствуют о возможном участии аутоантител к ДНК в физиологических перестройках организма у здоровых лиц.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Коликова Ю.О. Аутоантитела к ДНК: половой диморфизм и возрастная динамика их содержания в сыворотке крови здоровых лиц / Ю.О. Коликова, П.В. Фурманова, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Иммунология. - 2003. - №4. - С.23-25.
2. Коликова Ю.О. Клинические и иммунологические признаки диффузного заболевания соединительной ткани у больных рассеянным склерозом / И.В. Султанова, Ю.О. Коликова, Т.В. Матвеева, М.И. Арлеевская, Д.Г. Ишмухаметова // Неврологический вестник. - 2003. - №1. - С.39-41.
3. Коликова Ю.О. Зависимость уровня содержания и полиспецифичности аутоантител к ДНК в сыворотке крови здоровых лиц от возраста / Ю.О. Коликова, П.В. Фурманова, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Тез. науч. докл. III Съезда Биохимического общества. - Санкт-Петербург, 2002. - С. 178-179.
4. Коликова Ю.О. Фракционный состав аутоантител к ДНК при аутоиммунных заболеваниях / Н.В. Коннова, Ю.О. Коликова, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Тез. науч. докл. III Съезда Биохимического общества. - Санкт-Петербург, 2002. - С.179-180.
5. Коликова Ю.О. Уровень содержания аутоантител к ДНК в сыворотке крови при обострении и ремиссии рассеянного склероза / Т.В. Матвеева, Ю.О. Коликова, И.В. Султанова, М.И. Арлеевская, Д.Г. Ишмухаметова // Материалы II Российской конф. молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», 24-28 апр. 2001. - Москва, 2001,-С.370.
6. Коликова Ю.О. Аутоантитела к ДНК в сыворотке крови здоровых лиц / Ю.О. Коликова, Н.В. Коннова, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Материалы II Российской конф. молодых ученых России с международным участием

«Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины», 24-28 апр. 2001. - Москва, 2001.-С.191-192.

7. Коликова Ю.О. Аутоантитела к ДНК: половой диморфизм их содержания в сыворотке крови в норме / Ю.О. Коликова, П.В. Фурманова, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Материалы IV науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Республики Татарстан, 11-12 дек. 2001.-Казань, 2001.-С.33.
8. Коликова Ю.О. Содержание ААТ к ДНК у больных рассеянным склерозом в зависимости от активности процесса / Т.В. Матвеева, Ю.О. Коликова, И.В. Султанова, М.И. Арлеевская, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Материалы VIII Всероссийского съезда неврологов, 21-24 мая 2001. - Казань, 2001. - С.84-85.
9. Коликова Ю.О. Биологическая роль аутоантител к ДНК в норме / Ю.О. Коликова, Д.Г. Ишмухаметова, В.Г. Винтер // Сб. докл. XII юбилейной конф. "Ферменты микроорганизмов". — Казань, 2001. - С. 115-116.
10. Коликова Ю.О. Возрастные изменения содержания аутоантител в сыворотке крови здоровых лиц / Ю.О. Коликова, А.С. Зайнуллина // Сб. тез. докл. науч.-практ. конф. молодых ученых, 23 апр. 1998. - Казань: "ДАС", 1998.- С.29.
11. Коликова Ю.О. Физиологическая роль аутоантител к ядерным антигенам / Ю.О. Коликова, А.С. Зайнуллина, Ф.С. Гилмуллина // Сб. тез. докл. III Республиканской науч. конф. молодых ученых и специалистов, 10-11 окт. 1997. - Казань, 1998.-С.63.
12. Коликова Ю.О. Изменение уровня содержания аутоантител в онтогенезе / А.С. Зайнуллина, Ю.О. Коликова // Сб. тез. докл. III Республиканской науч. конф. молодых ученых и специалистов, 10-11 окт. 1997. - Казань, 1998. - С.60-61.

